

長 部 雅 之 (福岡県) 昭和30年2月20日生

授与年月日 平成3年8月31日

主 論 文 Tranilast (N-5') の細胞性免疫—遅延型過敏反応—に対する影響

論文内容の要旨

緒 言

肥満細胞からの chemical mediator の遊離を阻止する抗アレルギー剤の Tranilast (N-5') は、ケロイドを改善するという報告があり、肉芽形成も抑制すると考えられている。ケロイドの生産の担い手である線維芽細胞の増殖やコラーゲン合成に T 細胞が関与していることから、N-5' は T リンパ球を介する反応である細胞性免疫を抑制している可能性がある。本研究では、N-5' の細胞性免疫とくに遅延型過敏反応への影響を in vitro で検討した。

対象および方法

(1) N-5' の BCG—CWS 抗原に対するリンパ球幼若化反応の抑制：PPD 皮内反応がもっとも強い健康成人よりヘパリン採血した末梢静脈血から Ficoll-Conray (比重1.0778) にてリンパ球層を採取した。1×10⁶個のリンパ球に結核菌菌体成分 (以下 BCG—CWS) 5μg を加え、N-5' を 20μg より倍数希釈したものを添加した。6日間培養した後、³H—TdR1μCi を添加、さらに16時間培養し試料を採取し、液体シンチレーションカウンターにて³H—TdR の取り込み (count per minute:cpm) を測定した。BCG—CWS 抗原に対するリンパ球幼若化能は、次式の stimulation index (SI) であらわした。

Stimulation index

$$= \frac{\text{抗原添加群 (cpm)} - \text{background (cpm)}}{\text{抗原非添加群 (cpm)} - \text{background (cpm)}}$$

(2) BCG—CWS 抗原によるリンパ球幼若化反応に働くリンパ球サブセット：(1)と同様の方法で採取したリンパ球を、OKT3, OKT4, OKT8 モノクローナル抗体と家兎補体で処理した後、1×10⁶個のリンパ球に

BCG—CWS 抗原 5μg を添加し、6日間培養した、³H—TdR1μCi を添加し、さらに16時間培養後、³H—TdR の取り込みを測定した。

(3) N-5' のリンホカイン放出への影響：末梢静脈血より Ficoll—Conray 法およびプラスチックシャーレ法によりマクロファージを採取した。4×10⁶個のマクロファージと 5×10³個の S 1509a 細胞 (A/J 由来メチルコラントレン誘発マウス肉腫細胞) を平底マイクロプレートに混注したものに、BCG—CWS 抗原単独または BCG—CWS 抗原と N-5' を添加してリンパ球を培養した上清を加えて、24時間培養した。³H—TdR0.1μCi を添加後、さらに16時間培養し、³H—TdR の取り込みを測定した。Percent cytostasis は次式であらわした。

Percent cytostasis =

(リンパ球のみの培養上清添加の cpm—BCG 単独あるいは BCG と N-5' 添加リンパ球培養上清を加えた cpm) × 100

(リンパ球のみの培養上清添加の cpm)

(4) N-5' の DNA 合成に対する影響：1×10⁶個の S1509a 細胞を平底マイクロプレート内に分注し、N-5' を添加した。2日間培養した後、³H—TdR の取り込みを測定した。培養終了16時間前に³H—TdR0.1μCi を添加した。

結 果

(1) BCG—CWS 抗原のみの添加群の SI は 28.4 であり、N-5' を 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63μg 添加した群では、SI はそれぞれ 1.1, 1.6, 5.4, 9.0, 10.8, 31.2 であった。

(2) OKT3 モノクローナル抗体と補体、OKT4 モノクローナル抗体と補体で処理したリンパ球の BCG—CWS 抗原による幼若化反応は、SI1.8 と 3.2 でほとんど認められなかった。OKT8 モノクローナル抗体と補体で処理したリンパ球では SI は 13.6 であった。また、補体のみで処理したリンパ球の SI は 25.5 であり、未処理のリンパ球の SI の 31.8 と有意差はみられなかった。

(3) リンパ球のみ培養した上清を添加したものは、³H—TdR の取り込み (cpm) は 20322±518 であった。BCG—CWS 抗原、BCG—CWS 抗原と N-5' を 5μg, 20μg 添加して培養した上清を加えたものでは、cpm はそれぞれ 9142±485, 13248±515, 15420±519 であり、percent cytostasis はそれぞれ 55%, 35%, 24% であった。

(4) S1509a のみ群の³H—TdR の取り込み (cpm) と N-5' を添加した群の cpm とは差がなかった。

考察および結論

N-5' は、BCG—CWS 抗原によるリンパ球幼若化反応を濃度依存的に抑制することが明らかになった。ま

た、このリンパ球幼若化反応はおもに OKT4 陽性 T 細胞が働いていると判断された。

活性化マクロファージによる腫瘍細胞に対する cytostasis が、N-5' を添加した BCG-CWS 抗原によるリンパ球幼若化反応の培養上清を加えたもので低下傾向がみられ、N-5' はリンフォカイン放出も抑制していると考えられた。

N-5' は、メチルコラントレン誘発マウス肉腫細胞の増殖は抑制せず、DNA 合成に対する影響は少ないと考えられた。

以上より、N-5' は、遅延型過敏反応を抑制していることが証明された。

論文審査の結果の要旨

長部雅之は昭和55年3月長崎大学医学部を卒業し、医師国家試験に合格、昭和55年6月より現在に至るまで長崎大学医学部第二内科学教室に医員、研究生として勤務し、第二内科学教室主任原耕平教授の指導をうけ、内科学ことに消化器病学に関する研究に従事し、研究業績をあげた。

平成3年3月「Tranilast (N-5') の細胞性免疫遅延型過敏反応に対する影響」を完成し、これを主論文とし、「腹腔内に多発性嚢胞状に発育した悪性神経鞘腫の1例」他21編を参考論文として、長崎大学大学院に医学博士の学位を申請した。

長崎大学大学院医学研究科委員会はこれを平成3年6月19日定例委員会に討議し、論文の内容の要旨を検討し、研究経歴を審査した結果、受理して差し支えないものと認めたので、上記の通り審査委員を選定した。

委員は主査を中心とし慎重審査の上、平成3年8月21日の定例委員会でその結果を報告した。主論文は、肥満細胞からの chemical mediator の遊離を阻止する抗アレルギー剤の tranilast (N-5') の遅延型過敏反応に対する影響を、in vitro で検討したものである。N-5' は結核菌菌体成分 (BCG-CWS) によるリンパ球幼若化反応を濃度依存的に抑制していた。BCG-CWS 刺激リンパ球培養上清はマクロファージの腫瘍細胞に対する cytostasis 作用を誘導するが、それは、N-5' 添加時の培養上清では低かった。このことより、N-5' はリンフォカイン放出も抑制していると考えられた。また、N-5' はマウス肉腫細胞の増殖反応は抑制せず、DNA 合成に対する影響は少ないものと考えられた。モノクローナル抗体 OKT3、OKT4、OKT8 と補体で前処理をしたリンパ球の BCG-CWS 抗原によるリンパ球幼若化反応では、OKT3 と OKT4 によって著しく幼若化反応が抑えられる結果であった。以上の成績は、N-5' が OKT4 陽性 T 細胞が働いている遅延型過敏性反応を抑制しているものと判断することができる。本論文はこの点において高く評価できる。

研究科委員会は審査委員の報告にもとづき、これを討論に付して審議した結果、本論文は医学的進歩に貢献するところ大であって学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	原	耕	平
	副査	教授	吉	田	彦太郎
	副査	教授	珠	玖	洋